作物種原

## 淺談AFLP分子標幟—

# 種原遺傳歧異分析與品種鑑定的新寵兒

◎農試所種原室　陳 述　范明仁

植物種原所具有的遺傳歧異是作物育種的原動力，因此成功的種原收集保存與育種計畫皆端賴對於物種遺傳歧異度的瞭解；而一旦育成了優良的品種，更應積極建立詳細的品種鑑定資料，一方面可以保障育種者的智慧財產權，另一方面則可作為種苗生產業者的品質管制之用。

無論是種原的遺傳歧異分析或是育成品種的鑑定技術，均可藉由外形性狀、遺傳基因之初級產物（如：蛋白質、同功異構酵素）與DNA分子標幟等各方面進行。由於DNA分子標幟具有不受環境影響、可利用的標幟數目多、以及可直接反映DNA序列的差異等優點，因此被認為是偵測種原遺傳歧異與進行品種鑑定的良好工具。

目前被大家所廣泛運用的DNA分子標幟包括: 1980年由Botstein等人所提出的”限制片段長度多型性“ (Restriction Fragment Length Polymorphism；RFLP)，1990年由Williams等人所提出的 “核酸逢機增殖多型性“ (Random Amplified Polymorphic DNA；RAPD)，以及1989年由Tautz所提出的“簡單序列重複”(Simple Sequence Repeat；SSR or microsatellite)。

其中RFLP是最早被利用的分子標幟，其缺點為分析流程太長，需耗費大量時間與人力，所須的樣品DNA量多，且在同一次分析中所能偵得的基因座較少；而之後所發展出的SSR與RAPD，係以聚合酵素連鎖反應為基礎(PCR-based)的分子標幟，因此相較於RFLP而言，分析過程變得快速簡單，且每次分析所可偵得的基因座較多。不過這兩種分子標幟也各有缺點，其中RAPD的缺點是對於試驗的反應條件相當敏感，因而導致了再現性低的問題；而SSR標幟的缺點為尋找這些簡單序列重複的基因座及發展專屬的核酸引子是相當耗時與昂貴的。因此，對於須要檢定大量樣品，以及累積大量具可靠性之多型性條帶，以進行後續統計辨認分析的種原遺傳歧異分析與品種鑑定研究而言，耗時、耗力與低再現性等問題始終是嘗試利用分子標幟進行種原遺傳歧異分析與品種鑑定研究者心中的痛！令人不禁引頸企盼著是否能夠尋找到一個可以較經濟的人力、時間與金錢，即能偵得相當多的基因座變異，且又具試驗再現性高的分子標幟！

1993年Zabeau等學者提出了一個新的DNA指紋

分析技術一增殖片段長度多型性(Amplified Fragment Length Polymorphism；AFLP)，取得了歐洲專利應用權(European Patent Application No.0534858)。1995年這群學者在著名的Nucleic Acid Research期刊上發表描述了這個新的DNA指紋分析技術的原理，此時AFLP便開始受到了全世界研究者的重視。而我們也一眼認出了AFLP 正是那個引頸企盼多年的理想分子標幟，勢必成為未來進行種原遺傳歧異分析與品種鑑定的新寵兒!

AFLP到底有著什麼樣的魅力? 讓人如此這般著迷與奮不顧身的擠進它的懷抱呢? 因為它的主要特色是"快"、"再現性高"與"偵得條帶數目多"。而這樣的特色其實是源於其設計原理所造成！AFLP的基本原理為針對基因組內限制片段進行PCR增殖的技術（詳圖1），因此亦屬於以PCR反應為基礎的分子標幟，所以基本上承襲了PCR分析流程"快速"的特色;但就再現性而言，由於AFLP採取了RFLP原理的前半段，即首先以限制酵素將基因組切割成為限制片段，然後利用限制片段切口具有"專一辨認序列"的特點，做為在進行PCR反應時所使用的引子（pri-mer）設計上下功夫，使得引子在與DNA模板（即限制片段）復合時條件相當嚴格，因而提高了PCR結果的再現性，所以Za- beau等原創AFLP的學者稱AFLP是綜合了RFLP技術"可靠"（再現性高），以及PCR技術"快速高效率"的優點 。之後許多研究學者都曾嘗試以實驗驗證AFLP是否確有著如Zabeau等學者所言之優點，結果多是正面的答案，其中規模最大的是1997年數個歐洲分生實驗室共同合作嘗試比較在同一種試驗操作步驟下，由各不同實驗室所作出的條帶圖譜是否一致，以瞭解於各實驗室間交換彙集試驗結果資料的可行性，參與比較的分子標幟包括RAPD、AFLP 與SSR，結果顯示AFLP再現性最高，來自於6個實驗室針對兩個甜菜品系，以2對引子組合進行AFLP分析所得的條帶圖譜中，僅其中一個實驗室有一條帶缺失，其餘結果均同，因此顯示就目前所採用的分子標幟而言，AFLP確實具有較高的再現性。最後，再就偵側遺傳歧異訊息的能力而言，許多研究報告也已証實利用AFLP分子標幟每次分析所可偵得的基因座數目，較以往所使用的RFLP、RAPD與SSR為多。而正由於AFLP這種可允許大數量的限制片段快速專一進行增殖的特色，因此可在短時間內快速檢定大量樣品與累積大量可靠的多型性條帶資料，這正是它的魅力所在。

前述曾提及AFLP是採用了RFLP原理的前半段，並在後續的引子設計上下了功夫，才得以提高再現性，以下便逐一作更詳盡的介紹。AFLP的主要步驟為（圖一）：

1. 雙酵素切割（double digestion）

首先將基因組DNA以兩種限制酵素進行切割(digestion)，以得到限制片段。

2. 轉接子之黏接（ligation

of adapters）

在被切出的限制片段左右兩端各加上雙股的轉接子(adapter)，像兩個夾子一般地夾住限制片段，以作為後續進行PCR增殖時的模板DNA。而轉接子的特色是帶有前述所使用的限制酵素專一序列，因此才會與被切出的限制片段相黏接(ligation)。

3. PCR增殖（PCR amplification）

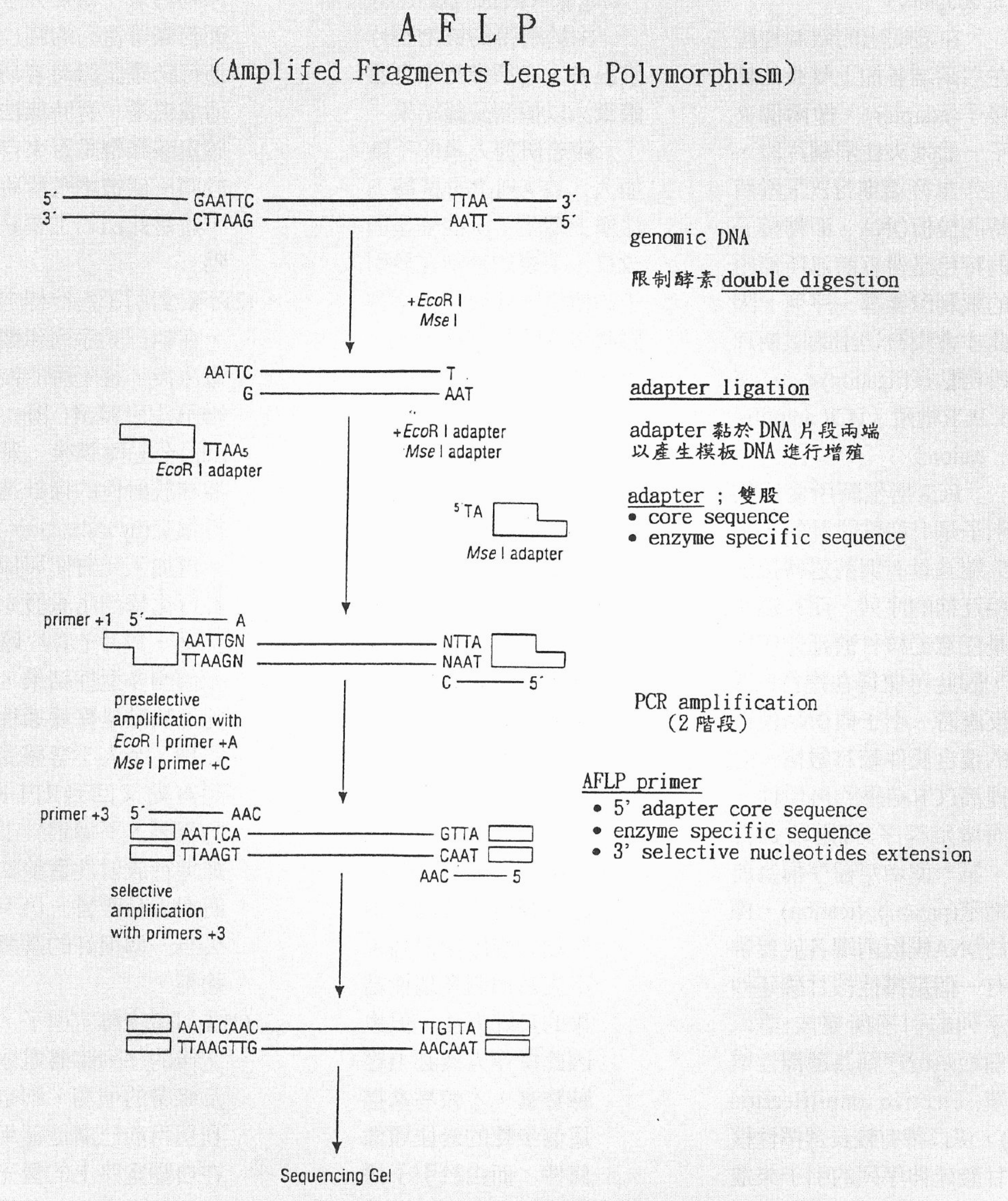
PCR增殖時所使用的引子是有特殊設計的，其5’端為具有與前述轉接子相互補的序列，而3’端才是任意的核甘酸延伸序列，因此可使得在進行PCR反應時，引子與DNA模板的復合條件較為嚴格，而提高PCR結果的再現性。而增殖程序分2階段進行，第一個增殖程序稱為前增殖(preamplification)，係於DNA模板兩端各放置帶有一個選擇性核甘酸延伸序列的引子所完成;第二個增殖程序稱為選擇性增殖(selective amplification)，係以帶有較長選擇性核甘酸延伸序列的引子來進行增殖反應。

4. 序列膠體電泳（sequencing gel electro- phoresis)

由於所得的被增殖片段很多，必須進行序列膠體電泳以偵測記錄結果。

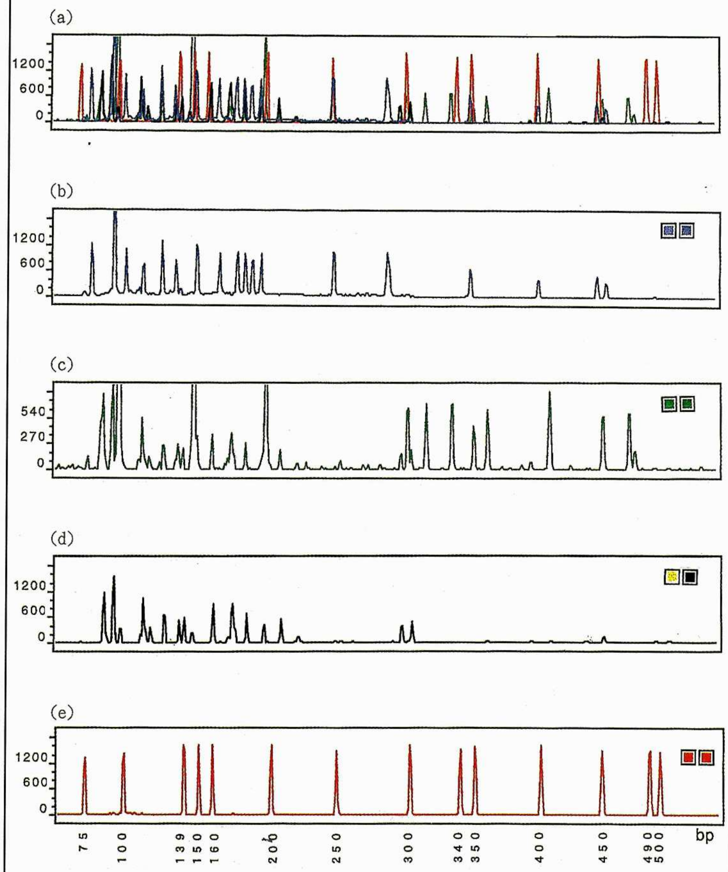
隨著研究人員的不斷加入，在AFLP的試驗方法學上產生了一些變型與改良，主要的差別在於引子的標定方式與後續序列膠體電泳的偵測技術上，目前被利用的方式包括：

1. 以放射性$P^{32}$標定引子，在執行序列膠體電泳後以X光底片曝光偵得多型性結果，這是Zabeau等學者最原始的作法，此法解析力高，唯一缺點是必須使用放射性進行實驗。
2. 不使用放射性的程序，作法有3種:
   (1)不針對引子進行任何標定，在執行完序列膠體電泳後以”銀染”進行條帶的偵測，由於銀染靈敏度很高，不失為偵測多型性結果的良好方法，但也因此操作人員必須經驗豐富，才較易拿捏這個步驟的最佳顯像條件。而由於引子係未經標定，因此所偵得結果是雙股DNA的泳動結果，當研究者面對條帶密布的膠片進行結果記錄時容易造成混淆，有時無法確定該條帶是否來自於同一個被增殖片段，這是此法的主要缺點。
   (2)不針對引子進行標定，在執行完序列膠體電泳後，將所得的被增殖片段轉漬( Blotting)至尼龍膜後，選擇非放射性的探針進行雜交(hybridization )，再加入受質使與探針行化學作用激發光反應，以X光底片曝光偵測多型性結果，此法缺點是實驗過程冗長，令人不禁感受到有點又回到RFLP的惡夢，不過對於不願進行放射性實驗的研究人員而言，仍不失為一個很好的選擇途徑。
   (3)先以螢光標定引子，之後的序列膠體電泳及條帶的偵測，則是利用目前已廣泛運用在自動定序上的螢光偵測技術進行。其優點為經由不同顏色螢




圖一、AFLP分子標幟的試驗程序

光所標定的引子在各別完成AFLP的選擇性PCR增殖反應步驟後，其所得的增殖產物可加以混合以同時進行多型性之偵測(如圖二筆者所作的綠豆種原之例)，因此又減少了不少樣品分析所須的時間，對於AFLP有“如虎添翼”的效果，且不同批試驗樣品間結果比對的正確性較佳！唯所須儀器較為昂貴，但若就研究所耗之時間、人力與結果比對的正確性考量而言，此法仍是相當值得投資的。




圖二、綠豆"BOLANGER"種原以藍色、綠色、黃色（以黑色代表）螢光標定之引子，混合(a)或分別(b,c,d)進行AFLP多變形偵測之結果。其中紅色部份(a,e)為DNA分子量標記；圖示左方為訊號強度。

以上我們針對AFLP的原理與現行試驗技術的演進作了一些簡單的介紹。目前AFLP的旋風也已逐漸在台灣登陸，中研院、台大農藝系與本所等單位均已開始了相關的試驗研究工作與應用。根據筆者以往利用RFLP、RAPD分子標幟的經驗比較，以及近日在AFLP試驗上的親身體驗，AFLP分子標幟的確是一個“快”(快速)、“狠”(所偵得之條帶數目多)、“準”(專一再現性高)的研究好幫手，是種原歧異分析與品種鑑定工作的新寵兒！當然，它的魅力並不僅止於種原研究方面，對於遺傳連鎖圖譜的建立，以及後續釐定基因與選殖的深入研究而言，其應用潛力極大，預期未來將會有更多的研究人員投入AFLP的陣營中。